

RO/KR 24. 05. 2004



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2004-0033733
Application Number

출원 년 월 일 : 2004년 05월 13일
Date of Application MAY 13, 2004

출원인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

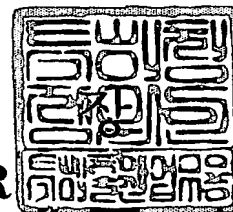
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2004 년 05 월 24 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.05.13
【발명의 명칭】	신규한 칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이드 균주와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법
【발명의 영문명칭】	Novel Candida tropicalis CJ-FID(KCTC 10457BP) and Manufacturing Method of Xylitol thereby
【출원인】	
【명칭】	씨제이 주식회사
【출원인코드】	1-1998-003466-9
【대리인】	
【성명】	조인제
【대리인코드】	9-1999-000606-6
【포괄위임등록번호】	2000-035353-0
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정훈
【성명의 영문표기】	KIM, Jung Hoon
【주민등록번호】	711020-1227116
【우편번호】	152-763
【주소】	서울특별시 구로구 구로1동 구일우성아파트 205-2001
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	손영록
【성명의 영문표기】	SOHN, Young Rok
【주민등록번호】	540925-1695817
【우편번호】	138-050
【주소】	서울특별시 송파구 방이동 올림픽선수촌아파트 253-601
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이운화
【성명의 영문표기】	LEE, Woon Hwa
【주민등록번호】	720824-1037911

【우편번호】	431-080
【주소】	경기도 안양시 동안구 호계동 한마음임광2차아파트 203-704
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박승원
【성명의 영문표기】	PARK, Seung Won
【주민등록번호】	670831-1683114
【우편번호】	449-840
【주소】	경기도 용인시 수지읍 풍덕천동 1180번지 진산마을삼성7차아파트 701 -101
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박강준
【성명의 영문표기】	PARK, Kang June
【주민등록번호】	591027-1665514
【우편번호】	406-130
【주소】	인천광역시 연수구 동춘동 대우3차아파트 109-201
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이기창
【성명의 영문표기】	LEE, Ki Chang
【주민등록번호】	560101-1149813
【우편번호】	400-103
【주소】	인천광역시 중구 신흥동3가 7-121
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	임재각
【성명의 영문표기】	LIM, Jae Kag
【주민등록번호】	560401-1036129
【우편번호】	137-040
【주소】	서울특별시 서초구 반포동 주공아파트 230-202
【국적】	KR

【우선권주장】

【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2003-0051593
【출원일자】 2003.07.25
【증명서류】 미첨부

【심사청구】

청구

【미생물기탁】

【기탁기관명】 국제기탁기관
【수탁번호】 KCTC 10457BP
【수탁일자】 2003.04.08

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 1
【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
조인제 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0 면	38,000 원
【가산출원료】	31 면	0 원
【우선권주장료】	1 건	20,000 원
【심사청구료】	4 항	237,000 원
【합계】		295,000 원

【첨부서류】

1. 미생물기탁증명서[동번역문]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 벌꿀로부터 분리한 신규한 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis* CJ-FID)(기탁번호 KCTC 10457BP)와 이를 직접 또는 알긴산으로 고정화한 후 고농도의 자일로스와 설탕을 함유하는 발효배지에서 배양하여 자일리톨이 생성된 배양액을 얻고, 수득된 자일리톨을 함유한 배양액으로부터 활성탄 컬럼 및 음이온 컬럼을 이용하여 정제한 후 최종적으로 분말형태의 자일리톨을 얻는 방법을 제공함으로써 고생산성, 고수율 및 고순도의 자일리톨을 제조할 수 있는데 그 효과가 있는 발명이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

자일리톨, 칸디다 트로피칼리스, 고정화, 배양조건, 배지조성, 발효

【명세서】

【발명의 명칭】

신규한 칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이드 균주와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법
 {Novel Candida tropicalis CJ-FID(KCTC 10457BP) and Manufacturing Method of Xylitol
 thereby}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨의 생산 정도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 초기 균체 농도에 따른 자일리톨의 생산 정도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 알긴산으로 고정화 시 사용되는 세포 농도에 따른 자일리톨의 생산성 및 수율의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 알기네이트 비드량의 따른 자일리톨의 생산성 및 수율의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 알긴산으로 고정화 시 효모 세포의 종배양 시간에 따른 자일리톨 생산 수율 및 생산량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 알긴산으로 고정화된 효모 세포를 사용하여 상기 실험에서 최적화된 조건으로 2L 발효조에서 시간에 따른 자일리톨 생산성 및 수율의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7은 알긴산으로 고정화된 효모 세포를 사용하여 상기 실험에서 최적화된 조건으로 17 L 발효조에서 시간에 따른 자일리톨 생산성 및 수율의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 수득된 자일리톨 배양액을 활성탄 컬럼에 통과시켜 얻어진 분취액내 자일리톨 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 도 8에서 얻어진 분취액을 음이온 컬럼에 통과시켜 얻어진 분취액 내 자일리톨 농도의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 도 9에서 얻어진 분취액의 고속액체크로마토그래피로 분석한 크로마토그램이다.

도 11은 도 9에서 얻어진 분취액을 농도 별로 농축한 후 결정화되는 정도를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<12> 본 발명은 신규한 균주인 칸디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) CJ-FID와 이를 이용한 자일리톨의 생산방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 별꿀로부터 분리한 신규한 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID 및 이를 직접 또는 알긴산으로 고정화한 후 고농도의 자일로스와 설탕을 함유하는 발효배지에서 배양하여 자일리톨이 생성된 배양액을 얻고, 수득된 자일리톨을 함유한 배양액으로부터 활성탄 컬럼 및 음이온 컬럼을 이용하여 자일리톨을 정제한 후 최종적으로 분말형태의 자일리톨을 얻는 방법을 제공함으로써 고생산성, 고수율 및 고순도의 자일리톨을 제조하는 방법에 관한 것이다.

<13> 자일리톨은 오탄당인 자일로스(xylose)의 환원성 말단기에 수소가 첨가되어 알코올기로 환원된 당알콜로서 자연계의 과일, 채소 및 버섯 등의 식물체에 소량 존재하고 또한 포유동물 탄수화물 대사의 중간산물로 알려져 있다. 자일리톨은 화학 구조상의 특징으로 인하여 다른 당류에 비하여 안정성이 높으며, 물과의 친화력이 높고, 갈색화 반응을 일으키지 않는다.

- <14> 자일리톨은 설탕과 같은 감미도를 나타내면서도 저칼로리이며 혈당 증가나 치아 우식증 등을 유발하지 않기 때문에 설탕 대체 감미료로서 우수성이 많이 입증되어 있으며(McNutt K., A. Sentki. 1996. Sugar replacers: a growing group of sweeteners in the United States. Nutr. Today. 31(6) : 255-261), 인체에 흡수되는 과정에 있어서 능동 확산 방식으로 장에서 흡수되거나 흡수되는 속도가 상당히 느려 완전히 흡수되지 않고 배설되며 흡수된 자일리톨은 장 내 미생물에 의해 분해되고 일부만이 인체에 이용되기 때문에 저칼로리 감미료로 분류된다.
- <15> 특히, 자일리톨은 당뇨병 환자가 자일리톨을 세포 조직 속으로 흡수 시 인슐린(insulin)을 필요로 하지 않아 당뇨병 환자를 위한 대용당으로 사용되고 있으며, 감미도가 설탕과 비슷하고 용해될 때 열 감소가 일어나는 특성으로 인하여 입안에서 느끼는 청량감이 커서 제과제품 및 껌 류 등의 식품의 여러 분야에서 응용되고 있고 충치 발생과 관련된 스트렙토코커스 류탄스의 생육을 저해하여 충치 발생을 억제하는 효과가 있어 치약 등의 원료로 사용되고 있다.
- <16> 자일리톨은 채소나 과일 등에 존재하기는 하나, 그 양이 미량이어서 이를 자연적으로 분리하는 것이 경제적이지 못한 문제점이 있었다. 즉, 지금까지 자일리톨은 목재, 벚짚 또는 수수 속 등에 존재하는 헤미셀룰로오스(hemicellulose)로부터 가수분해되어 나온 자일로스를 고온, 고압의 조건에서 자일리톨로 환원하는 화학적인 방법이 주로 사용되어 왔으나, 이러한 화학적 방법은 자일로스 또는 자일리톨과 헤미셀룰로오스 부분에서 생기는 다른 고분자당의 가수분해물들과의 분리와 정제가 용이하지 않을 뿐만 아니라 그 수율도 50 ~ 60% 정도로 낮다. 또한 고온 고압의 반응에 따른 위험성과 산이나 알칼리 사용에 의한 폐기물 문제가 존재하는 단점이 있다.
- <17> 다른 방법으로 미생물을 이용하는 것은, 미생물을 촉매처럼 사용하여 배지 중의 자일로스를 자일리톨로 생물 전환시키는 것이다. 즉, 배지로부터 세포막을 통과해 세포내로 수송된

자일로스가 NADPH를 조효소로 사용하는 자일로스 환원효소(XR)에 의해 자일리톨로 전환되고, 이 자일리톨이 세포내에 과량 축적된 후 세포밖으로 배출되는 것이다. 상기 미생물에 의한 방법은 반응 후 자일로스의 완전 소모로 인해 자일로스와 자일리톨의 분리공정이 필요하지 않으며, 상온 및 상압의 온건한 반응 조건 등의 장점이 있으나, 발효액에는 부생되는 유기산 및 글리세롤을 함유하는 경우가 대부분이며, 배지 성분이나 미생물 자체 유래의 성분들이 포함되어 있기 때문에 이러한 성분들만을 효과적으로 제거하여 고순도의 자일리톨을 효율적으로 정제하기가 어렵고 생산 수율 또한 낮은 문제점이 있었다.

<18> 대한민국특허출원 제10-2001-49918호 에서는 글루코노박터 옥시단스(*Gluconobacter oxydans* ATCC 621)을 이용하여 아라비톨로부터 자일리톨을 생산하여 최종 45 g/L 자일리톨 용액 200ml을 제조한 후, 이를 정제에 사용하였으나, 이는 정확한 정제 수율 계산이 되어 있지 않을 뿐만 아니라 낮은 농도(50g/L)의 자일리톨 용액을 사용함으로써 고농도, 고효율의 자일리톨을 정제하는 공정이 아니기 때문에 산업화하기에는 어려움이 따르는 문제점이 있었다. 따라서 최근에는 이러한 단점을 해결하기 위하여 신규한 효모 균주의 분리 및 이를 이용한 자일리톨의 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있는 실정이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<19> 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은, 신규한 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID 균주를 제공하고, 고생산성, 고수율 및 고순도의 자일리톨을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

<20> 본 발명의 상기 목적 및 기타 목적들은 하기 설명되는 본 발명에 의하여 모두 달성될 수 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <21> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 자일리톨을 생산하는 것을 특징으로 하는 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP)를 제공한다.
- <22> 또한 본 발명은, 알긴산 수용액에 칸디다 트로피칼리스 균주를 가하여 균질하게 교반한 후 이 용액을 칼슘염에 떨어뜨려 형성된 알기네이트 비드를 제공한다.
- <23> 또한 본 발명은, 자일리톨의 생산방법에 있어서, 자일로스와 설탕을 함유하는 자일리톨 생산 발효배지를 제조하는 단계; 상기 제조된 발효배지에 상기 칸디다 트로피칼리스 균주 함유 알기네이트 비드를 접종하는 단계; 및 상기 접종된 발효배지를 발효조에서 발효하는 단계;를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법을 제공한다.
- <24> 상기 자일리톨의 생산방법에는 상기 발효단계에서 생산된 자일리톨 함유 발효액을 활성탄 컬럼을 통하여 정제하는 단계; 상기 활성탄 컬럼으로 정제된 자일리톨액을 음이온 컬럼을 통하여 정제하는 단계; 및 상기 음이온 컬럼을 통하여 정제된 자일리톨액으로부터 자일리톨 분말을 제조하는 단계;를 추가로 포함하여 이루어질 수 있다.
- <25> 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하면 다음과 같다.
- <26> 자일리톨 생산 효모균주의 분리
- <27> 국내의 산지에서 채취된 천연 벌꿀을 멸균된 튜브에 직접 시료를 채취하여 적당히 희석한 후, 자일로스 200 내지 400g/L, 효모추출물(yeast extract) 5g/L, 펩톤(peptone) 5g/L, 아가(agar) 15 내지 20g/L가 포함된 평판배지를 이용하여 30℃에서 배양한 후, 상기 조건에서 성장이 빠른 효모 균주들을 중심으로 단일 군락(single colony)을 선별하였다.

<28> 자일리톨 생산 효모균주의 동정

<29> 상기한 조건 하에서 내당성 및 자일리톨 생성능이 우수한 효모 균주를 선별하여, 이를 형태학적, 생리학적 특성을 기초로 하여 분류하고 26S rRNA의 염기서열 분석을 통하여 서열목록 1의 염기서열을 얻음으로써 최종적으로 동정하였으며, 동정된 균주를 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID라고 명명하고, 생명공학연구소 유전자은행에 수탁번호 KCTC 10457BP로 기탁하였다.

<30> 자일리톨 생성능의 조사

<31> 선별한 효모 균주의 자일리톨 생성능을 조사하기 위하여 선별된 단일 군락을 자일로스 20g/L, 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 2g/L가 첨가된 배지 50mL이 들어있는 250 mL의 플라스크에 접종하여 진탕 배양기에서 200rpm, 30℃로 12시간 종배양하였다. 이 후, 자일로스 100g/L, 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 10g/L가 첨가된 본 배양용 배지 100mL이 들어있는 500mL의 플라스크에 5% 접종하여 진탕 배양기에서 150rpm, 30℃로 하여 42시간 동안 배양하였다. 배양 후 일정한 시간 간격으로 배양액의 일부 시료를 채취한 후, 자일리톨의 생성 여부를 조사하였다.

<32> 자일로스 및 자일리톨의 분석

<33> 생성된 자일리톨 및 자일로스의 분석은 채취한 시료를 원심분리기를 이용하여 12,000rpm으로 원심분리하여 세포를 제거하고, 상등액 만을 크로마실 100-10 NH₂ 칼럼(Kromasil, 덴마크)이 장착된 HPLC(Shimadzu, Japan)의 Refractive Index Detector(Shimadzu C-R6A, Japan)를 이

용하여 측정하였다. 이때, 용매는 90% 아세토나이트릴(Acetonitrile)을 사용하였고, 유속은 2.0 mL/분 이었다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

<34> 칸디다 트로피칼리스의 고정화

<35> 고정화 세포를 제조하기 위하여 식품용 알긴산 용액(3%, w/v)을 제조한 후, 여기에 동량의 세포 농축액을 혼합하여 교반한다. 이를 비드제조기를 이용하여 100 mM 염화칼륨 용액에 떨어뜨려 비드를 형성하고, 제조된 알기네이트 비드는 4℃에서 12 시간 동안 보관하여 비드의 강도를 증가시킨 후, 실험에 사용하였다.

<36> 칸디다 트로피칼리스를 이용한 자일리톨의 발효 방법

<37> 효모추출물 0.1 내지 10 g/L, 펩톤 0.1 내지 10 g/L 및 설탕 0.1 내지 50 g/L를 함유하고 자일로스가 포함된 발효배지를 발효조에 투입한 후, 상기 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP)를 직접 접종 또는 알긴산으로 고정화된 균주를 접종하고 배양온도를 25 내지 35℃에서 발효조의 교반속도를 200 내지 300rpm으로 조절하여 발효를 수행한다. 상기 발효는 통기량이 0.5 내지 2vvm에서 이루어지며, 60 내지 100 시간동안 발효를 시킨 후, 상기 배지를 원심분리하여 세포를 제거하고 상등액에서 자일리톨을 회수한다.

<38> 상기 배지에 투입되는 자일로스의 양은 50 내지 200 g/L가 바람직하며, 더욱 바람직하기로는 80 내지 150 g/L가 좋다. 만일 자일로스의 양이 50 g/L 미만인 경우에는, 자일리톨의 생산수율이 낮아지며, 200 g/L를 초과하는 경우에는 생산성이 더 이상 향상되지 않는다. 상기 배

지에는 생산성을 증가시키기 위하여 인산화칼륨(KH_2PO_4) 0.1 내지 5 g/L, 황화마그네슘(MgSO_4) 0.5 내지 5 g/L가 추가될 수 있다.

<39> 자일리톨 발효액의 정제 방법

<40> 상기에서 수득된 배양액으로부터 고순도로 정제된 자일리톨 분말을 제조하기 위하여 높이 60 cm, 직경 10cm의 column에 300g 활성탄을 충전한 후, 수득된 자일리톨 배양액을 통과시켜 탈취 및 탈색하였다. 얻어진 분취액은 높이 60 cm, 직경 10cm의 column에 음이온 레진이 충전된 음이온 컬럼을 통과시켜 자일리톨 용액 내 불순물을 제거하였다. 이와 같이 얻어진 자일리톨 용액을 HPLC로 분석한 결과, 용액 내에는 순수한 자일리톨만 존재함을 확인하였다.

<41> 분취된 자일리톨 용액을 농축장치를 이용하여 800 g/L 이상의 농도로 농축한 후, 4℃ 에서 결정화시키고, 주정용 에탄올을 첨가하여 교반하여 결정 자일리톨의 크기를 미세화하였다. 이를 진공여과 장치를 이용하여 에탄올 및 수분을 일부 제거하고 진공 건조기를 사용하여 자일리톨 분말 내에 존재하는 에탄올 및 수분을 제거하여 최종 자일리톨 분말을 제조하였다.

<42> 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 범위가 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<43> [실시예 1] 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨 생성능

<44> 상기한 바와 같이 종배양을 실시한 후, 자일리톨 생산을 위한 본 배양에서는 효모추출물 0.5, 펩톤 5 g/L, 설탕 10 내지 30 g/L가 첨가된 배지에 자일로스를

100 내지 300 g/L로 변화 시켜 첨가한 후, 배지부피가 10 L 가 되도록하여 15 L 발효조(한국발효기(주))를 사용하여 발효를 수행하였다. 발효과정 중에 교반속도는 250rpm으로 조절하였고 통기량은 1.0vvm, 배양온도는 30℃로 조절한 후, 초기 자일로스 농도에 따른 자일리톨 생성능을 조사하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

<45> 도 1에 나타난 것과 같이 최대 자일리톨 생산량은 187g/L였고, 생산 수율은 93.5%로 상당히 우수하였고, 설탕을 첨가함으로써 자일리톨 생산 수율이 증가함을 알 수 있었다.

<46> [실시에 2] 초기 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능

<47> 상기한 바와 같이 종배양을 실시한 후, 자일리톨 생산을 위한 본 배양에서는 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L, 설탕 10 g/L, 및 자일로스 100g/L가 첨가된 배지부피가 10L가 되도록하여 15L 발효조(한국발효기(주))를 사용하여 발효를 수행하였다. 발효과정 중에 교반속도는 250rpm으로 조절하였고 통기량은 1.0vvm, 배양온도는 30℃로 조절한 후, 초기 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능을 조사하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<48> 도 2에 나타난 것과 같이 최대 자일리톨 생산량은 132g/L였고, 사용된 자일로스 대비 자일리톨 생산 수율은 98%로 상당히 우수함을 알 수 있었으나 고농도 자일로스로 인한 자일리톨 생산 속도가 저하됨을 확인하였다.

<49> [실시에 3] 기존의 자일리톨 생성균주와 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP)의 내당성의 비교

<50> 상기에서 얻어진 본 발명의 균주와 기존의 자일리톨 생성균주의 내당성을 비교하여 하기 표 1에 나타내었다.

<51> 【표 1】

기존 자일리톨 생산가능 효모균주와의 내당성 비교

효모균주	자일로스 농도(g/L)			
	100	200	300	400
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7101	+++	+++	+	-
디바리오미세스 한세니 KCTC 7128	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7212	+++	+++	-	-
칸디다 과랍실롭시스 KCTC 7653	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7725	+++	+++	+	-
칸디다 트로피칼리스 KCTC 7901	+++	+++	-	-
칸디다 속 KCTC 17041	+++	+++	-	-
칸디다 세하타 KCCM 11895	+++	+++	+	-
칸디다 길리어몬디 KCCM 50050	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 KCCM 50091	+++	+++	+	-
칸디다 모기 KCCM 50199	+++	+++	-	-
칸디다 길리어몬디 KCCM 50631	+++	+++	-	-
칸디다 유틸리스 KCCM 50667	+++	+++	-	-
칸디다 트로피칼리스 씨제이-에프아이디 KCTC 10457BP	+++	+++	++	+

<52> (+++ : Best growth, ++ : good growth, + : growth, - : no growth)

<53> 상기 표 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의한 신규한 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP) 균주는 종래에 알려진 균주들에 비하여 높은 자일로스 농도에서도 내당성이 뛰어난 것을 알 수 있었으며, 이로 인하여 고농도 자일로스 배지에서 자일리톨의 대량 생산이 가능하게 되는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

<54> [실시예 4] 알긴산으로 고정된 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능

<55> 상기한 바와 같이 종배양을 실시한 후, 알기네이트 비드 내 포함되는 효모 세포의 농도에 따른 자일리톨 생산능을 측정하기 위하여 알기네이트 용액과 혼합되는 세포의 농도를 10 ~ 100(OD 값)으로 변화시켜 비드를 제조한 후 자일리톨 생산을 위한 본 배양에서는 효모추출물 5g/L, 펩톤 5g/L 및 자일로스 100g/L가 첨가된 배지부피가 10 L 가 되도록하여 15 L 발효조(한국발효기(주))를 사용하여 발효를 수행하였다. 발효과정 중에 교반속도는 250 rpm으로 조절하였고 통기량은 1.0 vvm, 배양온도는 30℃로 조절한 후, 초기 균체 농도에 따른 자일리톨 생성능을 조사하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<56> 도 3에 나타난 바와 같이 세포의 농도가 10 ~ 20(OD 값)일 때 약 0.5g/L.H이었고 농도가 50(OD 값)이상에서 1.25g/L.H로 증가하여 100(OD 값)일 때 최대 자일리톨 생산량인 1.65g/L.H임을 알 수 있었다.

<57> [실시예 5] 비드량에 따른 자일리톨 생성능

<58> 상기와 같이 비드를 제조한 후 자일리톨의 생산에 사용되는 자일리톨 생산용 배지에 첨가되는 비드의 양을 2.5 ~ 50 g 으로 변화시켜 2 L 발효조에서 상기 <실시예 4>의 조건에서 자일리톨 생산능을 조사하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<59> 도 4에서 나타난 바와 같이, 알기네이트 비드양의 변화에 관계없이 자일리톨의 생산량은 일정하게 유지됨을 알 수 있었다.

<60> [실시예 6] 종배양 시기에 따른 자일리톨 생성능

- <61> 상기와 같이 비드를 제조하는 과정에서 사용되는 종배양 세포의 배양시기에 따른 자일리톨의 생산능의 변화를 조사하기 위하여 효모균주의 종배양 시기를 각각 12 ~ 60 시간 동안 배양한 후, <실시에 4>의 조건에서 자일리톨 생산능을 조사하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- <62> 도 5에서 보는 바와 같이, 종배양 시간에 관계 없이 자일리톨의 생산량은 일정하게 나타남을 알 수 있으나 특히 24시간 동안 배양한 경우에 최고의 생산량을 나타내고 있음을 알 수 있었다.
- <63> [실시에 7] 고정화된 세포의 반복사용에 따른 자일리톨의 생산성 및 수율 변화
- <64> 상기와 같이 비드를 제조하고 <실시에 4>의 발효조건하에서 비드를 1 ~ 5회 반복하여 사용한 경우의 자일리톨의 생산성과 수율을 이전 발표 되었던 알지네이트 비드에 고정화된 칸디다 길리아몬디 (*Candida guilliermondi*) FTI 20037와 비교하여 하기 표 2에 나타내었다.

<65> 【표 2】

고정화된 칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP) 균주의 반복적 사용에 따른 자일리톨의 생산성 및 수율의 변화

	항 목	반 복 횟 수				
		1	2	3	4	5
칸디다 트로피칼리스 CJ-FID(KCTC 10457BP)	생산성(g/L.H)	3.31	2.95	3.04	3.11	2.99
	수율(%)	89.5	92.3	88.6	90.4	90.6
칸디다 길리아몬디 FTI 20037	생산성(g/L.H)	0.5	0.59	0.6	0.6	0.58
	수율(%)	53.2	59.5	62.6	62.4	61.4

- <66> 상기 표 2에서 나타난 바와 같이 고정화 세포를 5회 반복하여 사용하더라도 그 생산성과 수율에 있어서의 감소는 없음을 알 수 있었다. 특히 이전 발표 되었던 칸디다 길리아몬디 FTI 20037 균주와 비교하여 생산성은 5 배이상 수율은 45% 이상 높음을 알 수 있었다.

<67> [실시에 8] 발효시간에 따른 자일리톨 생성능

<68> 상기와 같이 비드를 제조하고 <실시에 4>의 발효조건하에서 2L 및 17L 발효조를 이용한 배양시간 별 자일리톨의 생산능을 조사하고 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

<69> 도 6 및 도 7에서 나타난 바와 같이, 자일리톨의 생산은 배양시간이 6시간 경과하였을 때부터 증가하기 시작하여 2L 발효조에서 배양한 경우 24시간 무렵에 최고 생산량을 보였으며 17L 발효조에서 배양한 경우 36시간 무렵에 최고 생산량을 보임을 알 수 있었다.

<70> [실시에 9] 자일리톨 발효액의 정제

<71> 상기 발효액의 정제방법과 같이 활성탄 컬럼 및 음이온 컬럼을 통과시켜 얻어진 분취액 내 자일리톨 농도의 변화를 도 8 및 도 9에 나타내었고, 도 9로부터 얻어진 분취액을 고속액체 크로마토그래피로 분석한 크로마토그램을 도 10에 나타내었으며, 도 9로부터 얻어진 분취액을 농도별로 농축한 후 결정화 되는 정도를 도 11에 나타내었다.

<72> 도 8에서 나타난 바와 같이 자일리톨 발효액을 활성탄 컬럼에 통과시킨 경우 분취액 4부분에서 최고 농도를 보였으며, 도 9의 음이온 컬럼을 통과시킨 경우 분취액 3 내지 5부분에서 최고 농도를 보임을 알 수 있으며 상기 활성탄 컬럼 및 음이온 컬럼을 통과시켜 얻은 분취액이 고도로 정제된 자일리톨임을 도 10의 크로마토그램을 통해 확인할 수 있다. 상기와 같이 정제된 자일리톨액을 농도별로 결정화한 결정화 수율은 자일리톨액의 농도가 높을수록 비례하여 결정화 수율이 증가함을 알 수 있었다.

<73> [실시예 10] 자일리톨 발효 및 정제 공정의 단계별 자일리톨의 농도 및 정제 수율

<74> 상기 발효 및 정제 과정에서 자일리톨 농도 및 정제 수율을 하기 표 3과 같이 각 단계별로 조사하였다.

<75> **【표 3】**

자일리톨 용액의 정제 공정 단계 별 정제 수율의 변화

공정	자일리톨 농도 (g/L)	정제 수율(%)
자일리톨 배양액(300 g/L)	270	90
활성탄 컬럼	270	90
이온 컬럼	262	87.3
농축화 단계	257	84.7
결정화 단계	244	80.4
분말화	230	76.4
최종 정제 수율	77.4	

<76> 상기 표 3에서 나타난 바와 같이 발효 및 정제 단계를 통한 자일리톨의 최종 수율은 77.4%의 고수율로 나타났음을 알 수 있고 각 단계별로 손실이 거의 없음을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<77> 이상에서 설명한 바와 같이 본 발명에 의한 신규한 칸디다 트로피칼리스 균주

CJ-FID(KCTC 10457BP) 및 이에 의한 자일리톨의 생산방법은 각종 배양조건 및 배지조성을 최적화 함으로써 고수율, 고생산성 및 고순도의 자일리톨을 생산하는 방법을 제공하는 효과가 있는 유용한 발명인 것이다.

<78> 상기에서 본 발명은 기재된 구체적인 실시예 및 실험예를 중심으로 상세히 설명되었지만, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

자일리톨을 생산하는 것을 특징으로 하는 칸디다 트로피칼리스 균주 CJ-FID(KCTC 10457BP)

【청구항 2】

알긴산 수용액에 칸디다 트로피칼리스 균주를 가하여 균질하게 교반한 후 이 용액을 칼슘염에 떨어뜨려 형성된 알기네이트 비드

【청구항 3】

자일리톨의 생산방법에 있어서,

자일로스와 설탕을 함유하는 자일리톨 생산 발효배지를 제조하는 단계;

상기 제조된 발효배지에 제2항의 칸디다 트로피칼리스 균주 함유 알기네이트 비드를 접종하는 단계; 및

상기 접종된 발효배지를 발효조에서 발효하는 단계;를 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법.

【청구항 4】

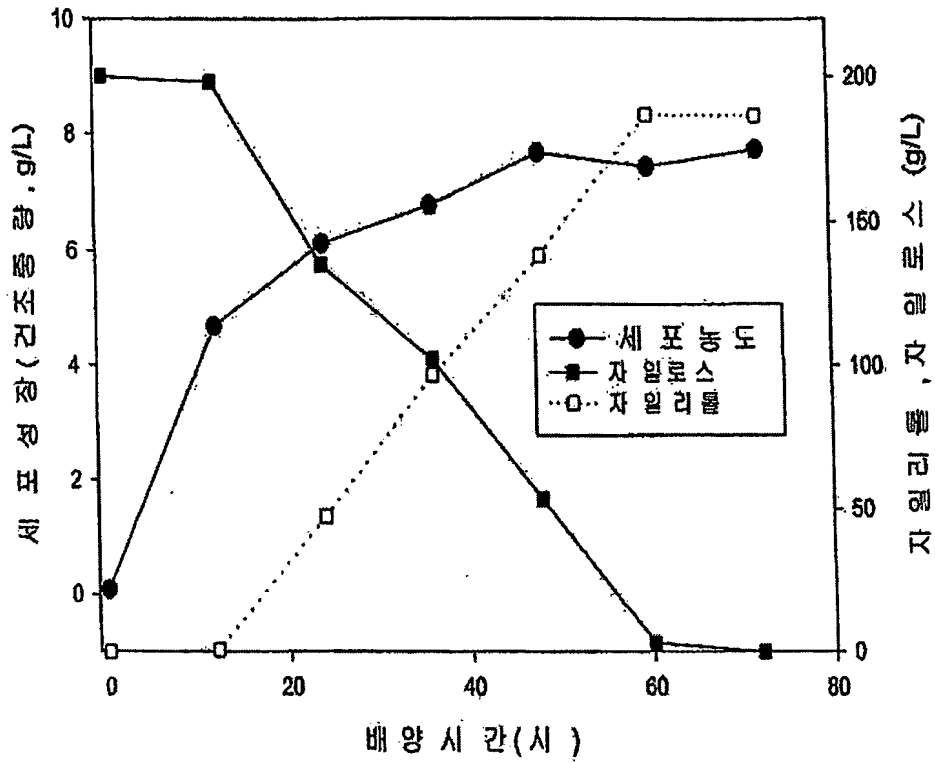
제3 항에 있어서,

상기 발효단계에서 생산된 자일리톨 함유 발효액을 활성탄 컬럼을 통하여 정제하는 단계;

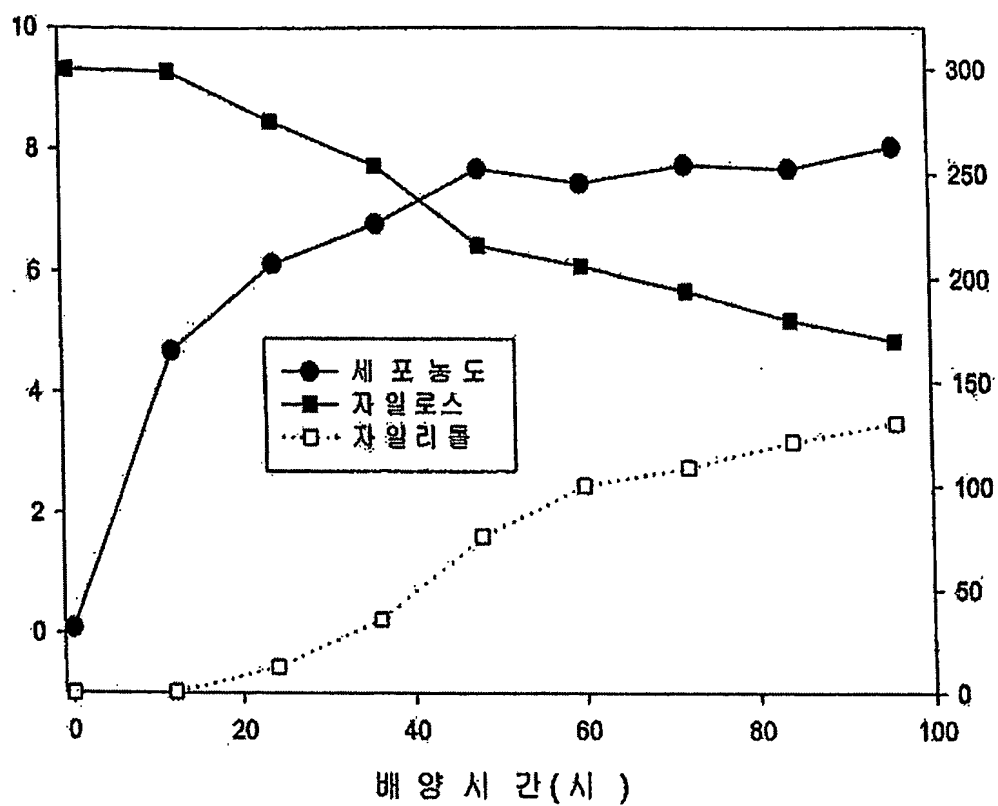
상기 활성탄 컬럼으로 정제된 자일리톨액을 음이온 컬럼을 통하여 정제하는 단계; 및
상기 음이온 컬럼을 통하여 정제된 자일리톨액으로부터 자일리톨 분말을 제조하는 단계;
를 추가로 포함하여 이루어짐을 특징으로 하는 자일리톨의 생산방법

【도면】

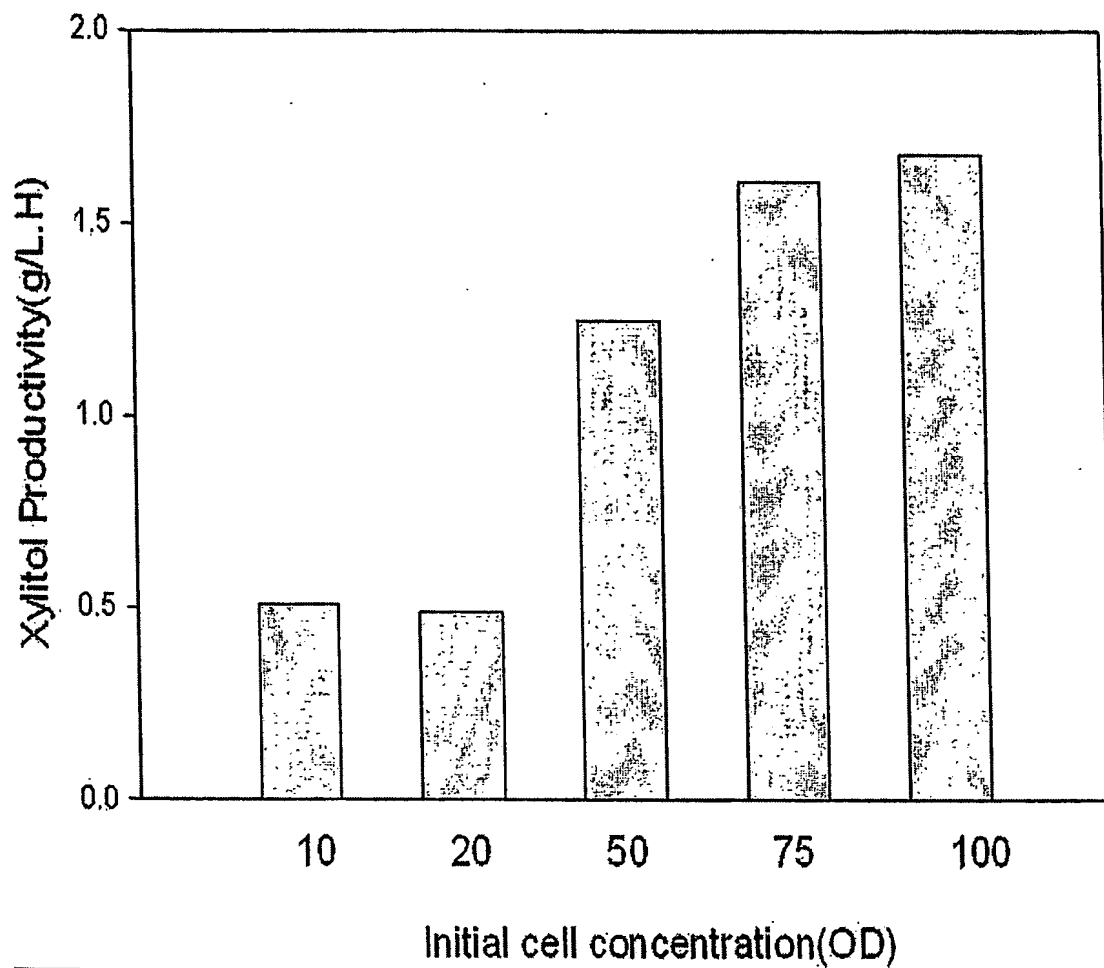
【도 1】



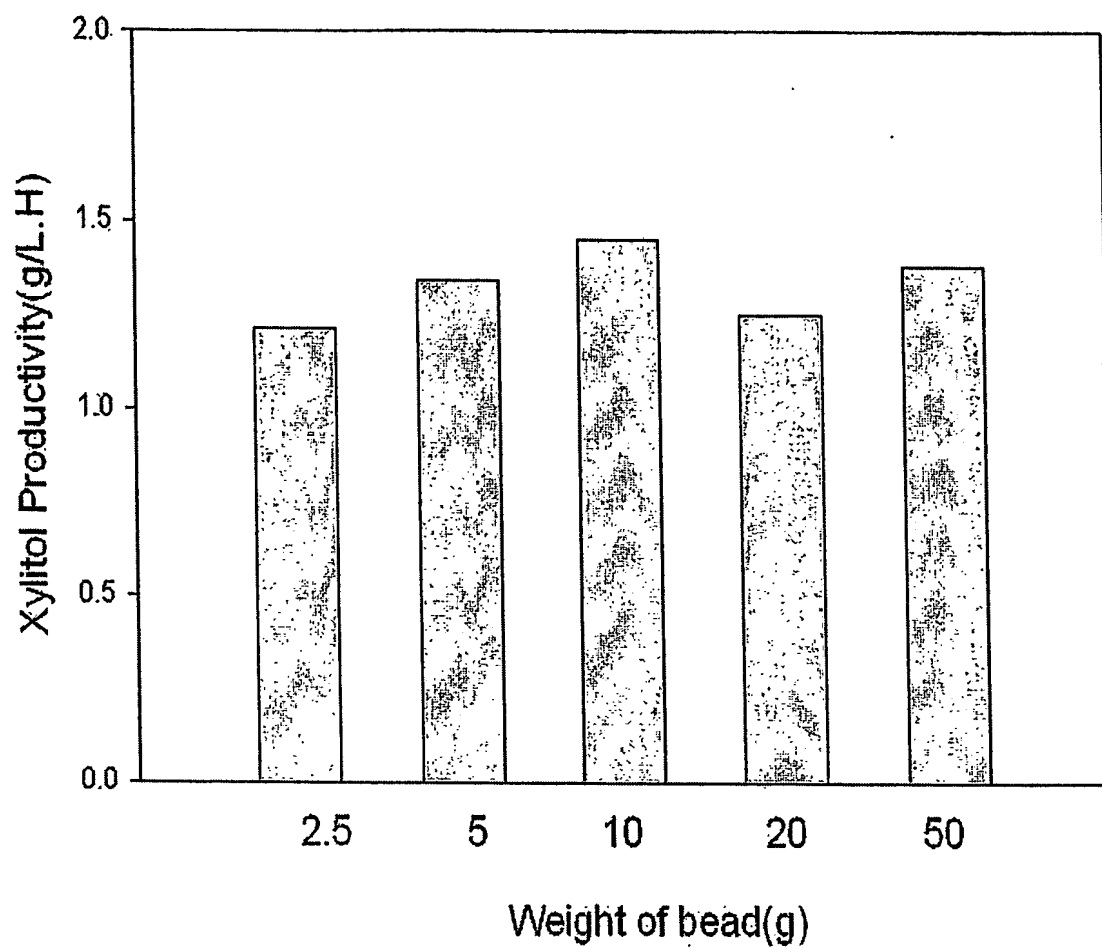
【도 2】



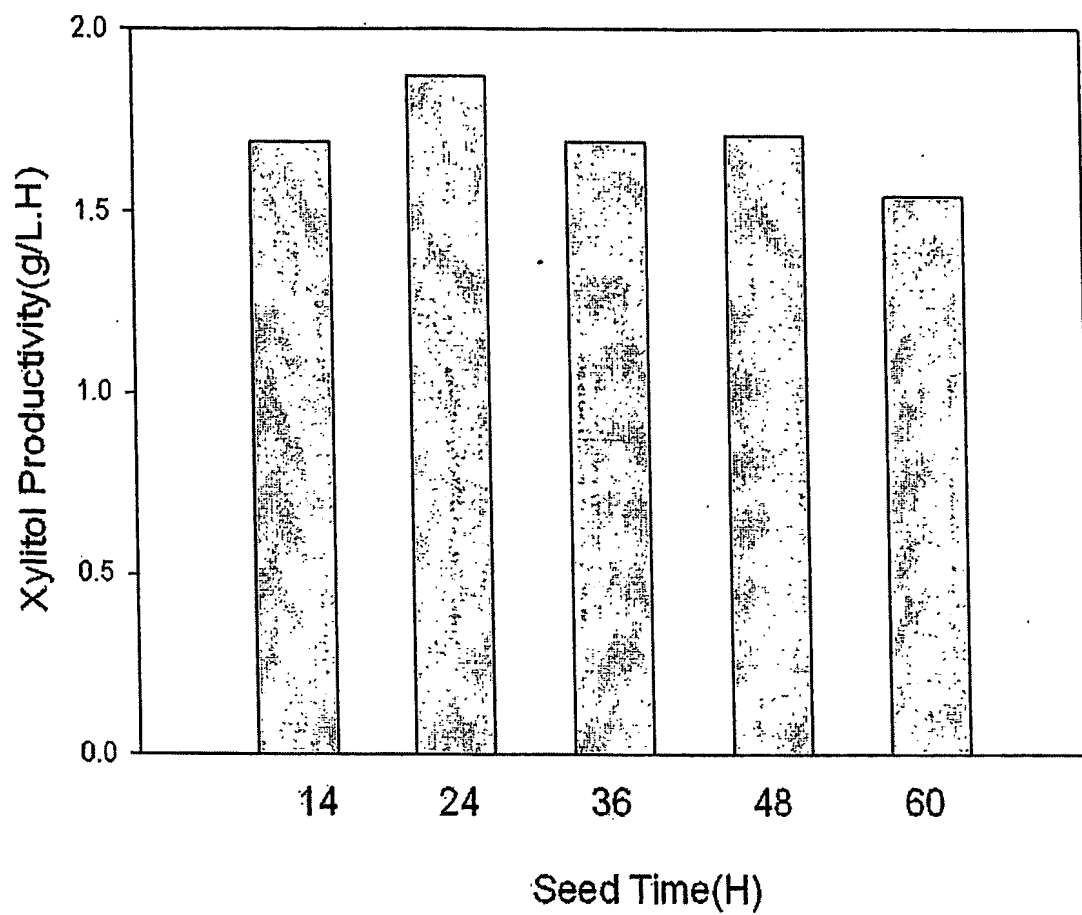
【도 3】



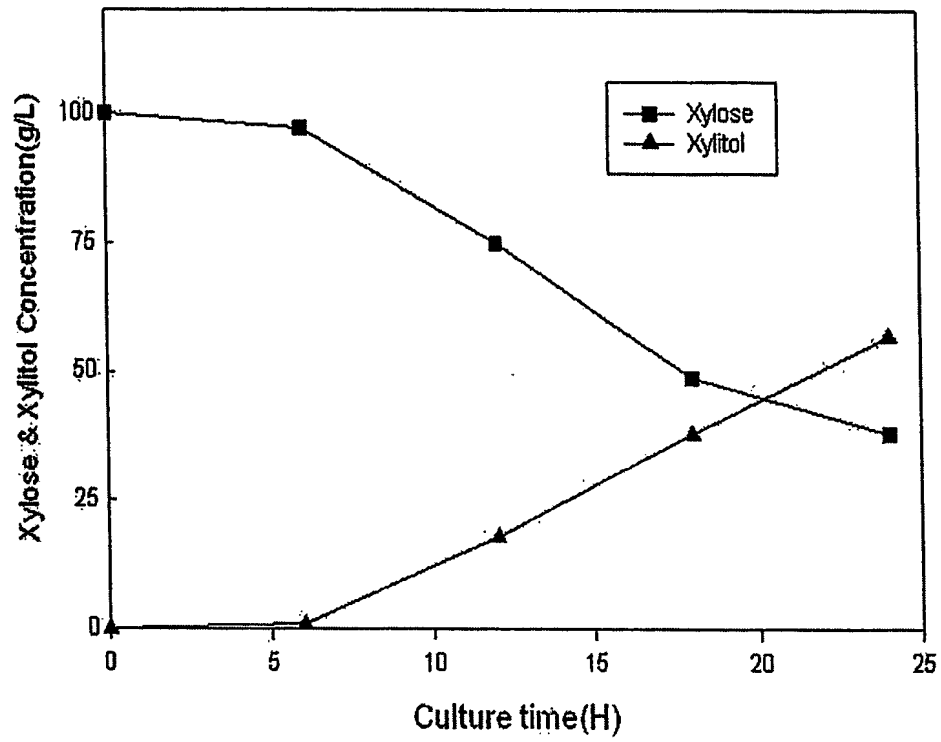
【도 4】



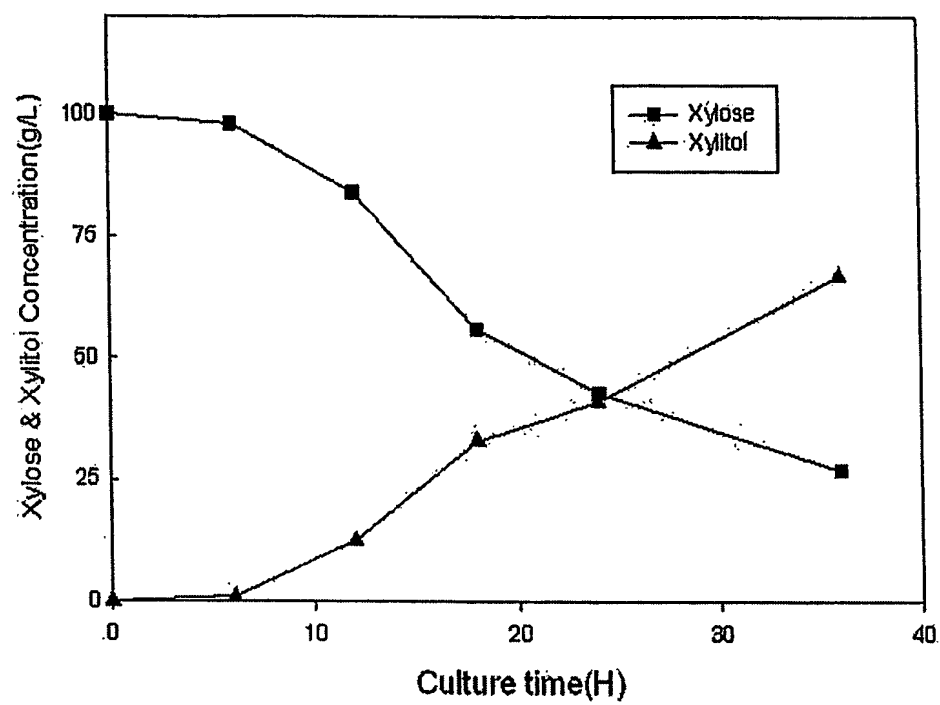
【도 5】



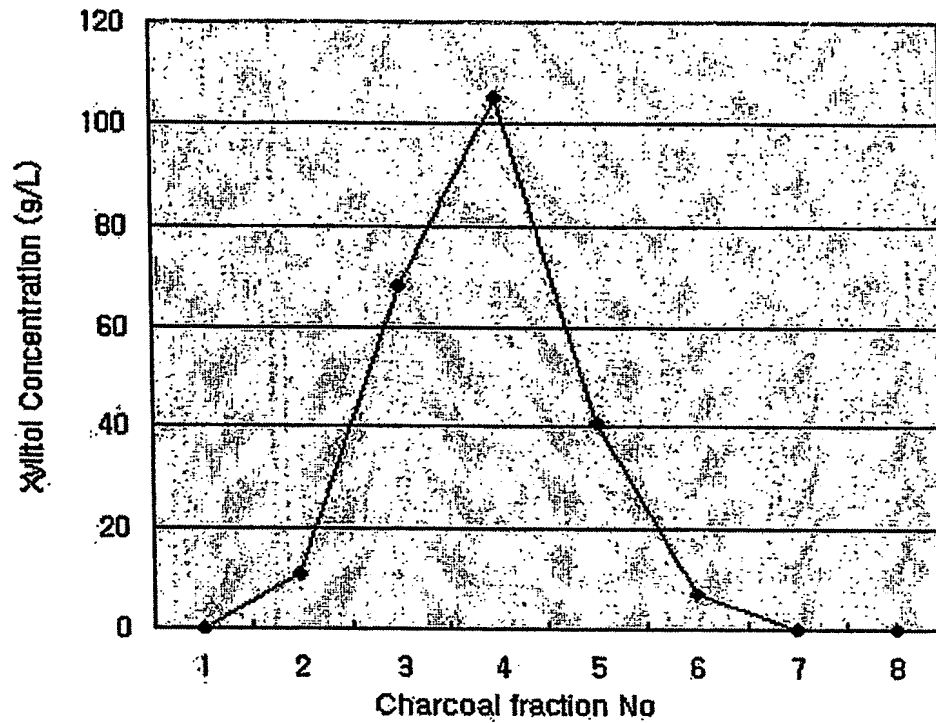
【도 6】



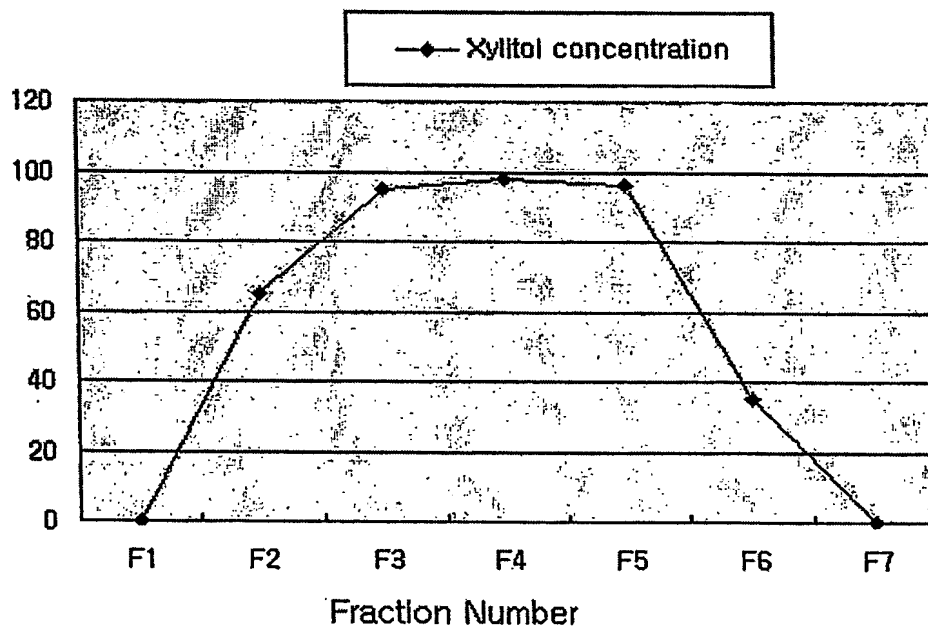
【도 7】



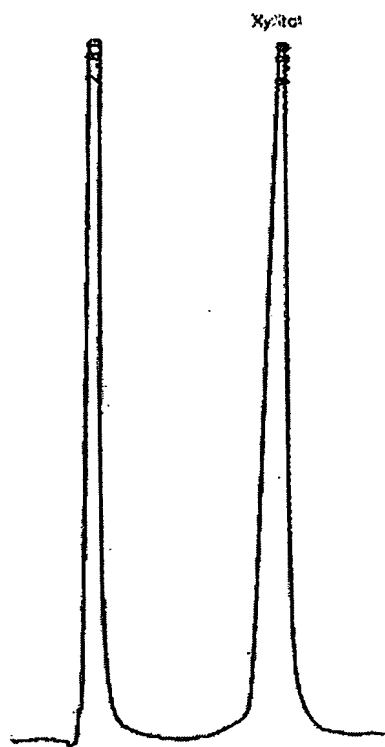
【도 8】



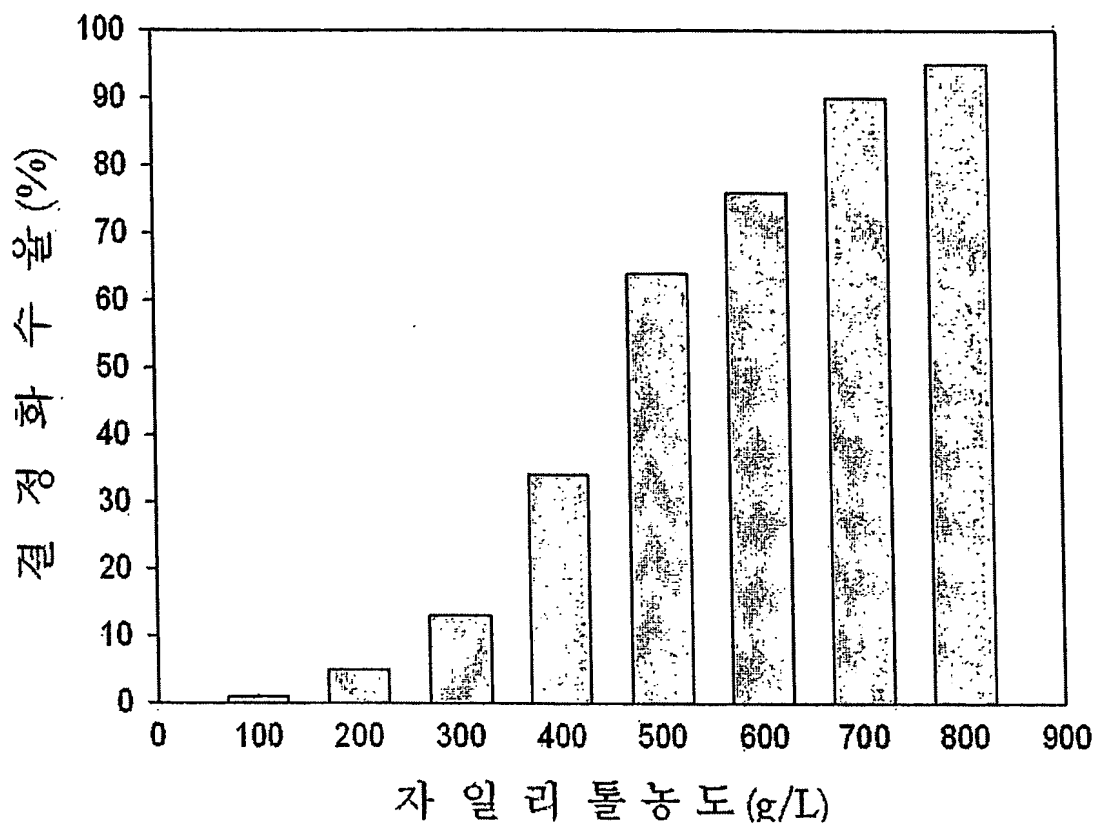
【도 9】



【도 10】



【도 11】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부